

培養神経細胞におけるシナプス形成，神経変性，神経再生機構の解析：同期した細胞内カルシウム一過性変動を指標にした神経再生モデルの作成

著者	梅澤 邦彦
号	1312
発行年	1996
URL	http://hdl.handle.net/10097/21258

氏 名（本籍）	うめ 梅	ざわ 澤	くに 邦	ひこ 彦
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）			
学 位 記 番 号	医 博 第 1 3 1 2 号			
学位授与年月日	平 成 8 年 3 月 26 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当			
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）外科学系専攻			
学 位 論 文 題 目	培養神経細胞におけるシナプス形成，神経変性， 神経再生機構の解析：同期した細胞内カルシウム 一過性変動を指標にした神経再生モデルの作成			
	(主 査)			
論 文 審 査 委 員	教授 吉 本 高 志 教授 渡 邊 建 彦			
	教授 八 尾 寛			

論 文 内 容 要 旨

頭部外傷、虚血、および出血などで脳に損傷を受けた場合、不可逆的な神経脱落症状が生じる。しかし、現在、神経損傷が原因の病的状態に対して我々は治療手段を殆ど持たない。この状況の原因の一つに、神経再生を正しく評価できる研究モデルがこれまで存在しなかったことがある。そこで本研究では神経再生を、多数の神経細胞が形成する回路上のシナプス活動の変化を指標に検討し、そのモデルを作成することを目的とした。そのために、1. ラット培養大脳皮質神経細胞間におけるシナプスの形成とその神経回路の特徴、2. 培養神経回路における神経変性機構の解析、3. 培養神経回路における神経再生機構の解析、以上の3項目に関して順次検討を行った。

1. 培養大脳皮質細胞間におけるシナプス形成に関して

複数の神経細胞間で同期した自発的細胞内 Ca^{2+} 変動の振動数 (oscillation frequency) と形態的に観察されるシナプスの数とが強い相関関係を示すことが判明した。したがって Ca^{2+} oscillation frequency を計測すれば、培養神経回路において形成されている実際のシナプスの数のある程度推定することが可能と考えられた。Oscillation を有する培養神経回路は、glutamate-receptor antagonist である APV や Na^+ channel blocker である TTX にて抑制されることから glutamate 作動性神経細胞が主体をなすと思われたが、GABA 産生酵素である glutamic acid decarboxylase に対する抗体にて検討した結果、抑制性神経細胞も含有し、発達に伴うシナプスの増加などの点でも in vivo の特徴を良く反映していた。更に、この神経回路に外部から薬物を投与することによって、その後のシナプス形成能を変化させることから、シナプス形成のメカニズムを探る上でも有用なモデルであることがわかった。

2. 培養神経回路における神経変性機構の解析

虚血、外傷そして変性疾患における神経細胞死の責任物質の一つと考えられている glutamate を培養神経回路に投与することによって個々の神経細胞死と回路上のシナプス活動の変化を検討した。その結果、glutamate が誘発する個々の神経細胞死は神経細胞の発達に応じてその程度が異なること、更に、神経回路においては、神経細胞死の程度とシナプス活動減少との関係は発達と共に変化することが見いだされた。また、回路上に多くの神経細胞が残存しているのにシナプス活動のみが消失する“シナプス死”とでもいうべき現象が見いだされた。glutamate を投与した神経回路上において形成されているシナプス数を電顕にて検討した結果、先の現象は神経細胞消失よりもシナプス部位の消失がより進行的に起こるために観察されたものと考えれ、神経回路上での個々の神経細胞の孤立化が神経細胞死に先行して起こることが示された。これらの事実から、変性として神経細胞死を扱う場合、その機能的変化である回路上のシナプス活動の変化を考

慮に入れる必要があり、その発達に伴う大きな変化の存在から、限定した同一の時期を対象にすべきことが判明した。

3. 神経回路における神経再生機構の解析：神経再生モデルの作成

シナプス活動を有する成熟した神経回路に $100\ \mu\text{M}$ glutamate を 60 分間投与し、変性状態を起こしてから、シナプス活動を示す oscillation の frequency を経時的に計測し、再増加する frequency を指標にして、神経再生のモデルを作成した。このモデルにおいて、再生し得るのは遅発性神経細胞死の状態からで、細胞死が終了した後にシナプス活動の再上昇が起こることが判明した。また glutamate $1000\ \mu\text{M}$ 程度の強い毒性では再生は起こり得ないことが frequency の経時変化にて判明した。更にこのモデルを使用して神経細胞に receptor の存在は知られていたが、作用の未知であった IL-2 が再生促進に働く可能性があることを示した。

これまで神経再生を扱った実験は、殆どが神経突起の伸展のみを指標にして、シナプス活動の変化を検討してこなかった。本研究で初めて示されたシナプス活動を指標にした培養神経回路における再生モデルは、再生メカニズムの研究や未知物質のスクリーニングに最適であると考えられる。またその神経回路における変性状態を検討した結果、シナプス死とでもいえる特異的な状態が神経細胞死に伴い出現することが始めて明らかになった。また、この神経回路の特徴を検討した結果、in vivo の状態と非常に似ており、シナプス形成機構やその後の turn-over、即ち高次脳機能発現のメカニズムを研究する上でも有用な系であることが示された。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究において、神経回路上のシナプス数とシナプス活動を簡単に推定できる培養神経細胞を使用した実験系が確立された。この実験系を使用して発表者は以下の検討を行っている。

1. 培養神経細胞間のシナプス形成過程を詳細に観察することによって、シナプス形成のメカニズムが発達によって大きく異なることを見いだした。更に、個々の神経細胞の電位の変化によるシナプス形成能の変化を調べることによって、一般に活動依存性と知られてきた神経回路の生成理論に対しても影響を与えた。

脳における記憶等の保持に、この実験系で認められた同期した細胞内 Ca^{2+} の変動を示す oscillation が深く関与するという報告が最近あり、この実験系を利用して神経細胞間の oscillation 生成のメカニズムを検討すれば、高次脳機能に対するモデルともなりうると考えられる。

2. 本研究ではこのシナプス活動を観測できる培養神経回路を使用して glutamate による神経細胞死を研究した。神経細胞死とシナプス活動の変化を同時に経時的に検討した結果、シナプス活動の変化と神経細胞死との関係が神経回路の発達状態によって大きく異なり、両者が大きく異なる事象であることを初めて報告した。

その検討過程において、十分な残存神経細胞があるにも関わらず、回路上のシナプス活動のみ消失する“シナプス死”とでもいうべき状態が存在することを明らかにした。更にこの状態におけるシナプス数の電子顕微鏡を使った計測により、この状態を起こすメカニズムがシナプス部位の早期崩壊によるものであることを発見した。

3. この神経回路上の変性状態を経時的に検討した結果、発表者はシナプス活動の再上昇を指標にした神経再生モデルの作成に成功した。これまでの再生モデルは神経細胞の突起伸展のみをその指標にするものが殆どであった事実を考えると、神経再生研究を進めるであろうモデルといえる。発表者も神経細胞上にその受容体の存在が確認され、効果がこれまで不明であった、cytokine のひとつである IL-2 に注目し、このモデルを使用してその神経再生促進効果を見いだした。

以上、in vitro においてシナプス活動を簡単に評価できる系を開発したことで、シナプス形成、神経変性、神経再生、さらには高次脳機能発現までも対象とした実験系の確立が期待される。

これらは今後の神経科学の発展に大きく貢献するものと思われ、本研究が博士号取得に十分値する研究と考えられた。